

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **2003-012532**

(43)Date of publication of application : **15.01.2003**

(51)Int.Cl.

A61K 35/78

A61K 7/00

A61K 7/48

A61P 17/00

A61P 43/00

(21)Application number : **2001-205953**

(71)Applicant : **MARUZEN PHARMACEUT CO LTD**

(22)Date of filing : **06.07.2001**

(72)Inventor : **NITTA NAMI**

(54) HYALURONIDASE INHIBITOR, HEXOSAMINIDASE LIBERATION INHIBITOR, CYCLIC AMP PHOSPHODIESTERASE INHIBITOR AND COSMETIC FOR AMELIORATING SKIN ROUGHENING

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new hyaluronidase inhibitor, hexosaminidase liberation inhibitor, cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor and cosmetic for ameliorating skin roughening.

SOLUTION: The new hyaluronidase inhibitor, hexosaminidase liberation inhibitor, cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor and cosmetic for ameliorating skin roughening are obtained by including an extract from *Ampelopsis cantoniensis* (Hook. et Arn.) Planch therein.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-12532

(P2003-12532A)

(43) 公開日 平成15年1月15日 (2003.1.15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 K 35/78		A 6 1 K 35/78	C 4 C 0 8 3
7/00		7/00	K 4 C 0 8 8
7/48		7/48	
A 6 1 P 17/00		A 6 1 P 17/00	
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 10 頁)			

(21) 出願番号 特願2001-205953(P2001-205953)

(22) 出願日 平成13年7月6日 (2001.7.6)

(71) 出願人 591082421

丸善製薬株式会社

広島県尾道市向東町14703番地の10

(72) 発明者 新田 奈美

広島県尾道市向東町14703番地の10 丸善
製薬株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロニダーゼ阻害剤、ヘキシサミニダーゼ遊離阻害剤、サイクリックAMPホスホジエステ
ラーゼ阻害剤及び肌荒れ改善化粧料

(57) 【要約】

【課題】 新規なヒアルロニダーゼ阻害剤、ヘキシサミニダーゼ遊離阻害剤、サイクリックAMPホスホジエステラーゼ阻害剤及び肌荒れ改善化粧料。

【解決手段】 新規なヒアルロニダーゼ阻害剤、ヘキシサミニダーゼ遊離阻害剤、サイクリックAMPホスホジエステラーゼ阻害剤及び肌荒れ改善化粧料に、藤茶からの抽出物を含有せしめる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 藤茶抽出物よりなるヒアルロニダーゼ阻害剤。

【請求項 2】 藤茶抽出物よりなるヘキシサミニダーゼ遊離阻害剤。

【請求項 3】 藤茶抽出物よりなるサイクリック AMP ホスホジエステラーゼ阻害剤。

【請求項 4】 請求項 1 記載のヒアルロニダーゼ阻害剤及び／又は請求項 2 記載のヘキシサミニダーゼ遊離阻害剤及び／又は請求項 3 記載のサイクリック AMP ホスホジエステラーゼ阻害剤を配合してなる肌荒れ改善化粧料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ヒアルロニダーゼ阻害剤、ヘキシサミニダーゼ遊離阻害剤、サイクリック AMP ホスホジエステラーゼ阻害剤及び肌荒れ改善化粧料に関する。

【0002】 具体的に言うと、炎症性の疾患、例えば接触性皮膚炎、乾癬、尋常性天疱瘡等による肌荒れ症状の他、乾燥や洗浄剤等によって惹起される健常人の肌荒れ、荒れ性に対して改善・予防効果を有するヒアルロニダーゼ阻害作用、ヘキシサミニダーゼ遊離阻害作用、サイクリック AMP ホスホジエステラーゼ阻害作用を有する植物抽出物よりなる新規なヒアルロニダーゼ阻害剤、ヘキシサミニダーゼ遊離阻害剤、サイクリック AMP ホスホジエステラーゼ阻害剤を利用した肌荒れ改善化粧料に関する。

【0003】

【従来の技術】 従来より、皮膚疾患や肌荒れに対して改善・予防効果を有するものとして、種々の治療薬、皮膚外用剤、化粧料等が知られている。

【0004】 これら従来の薬剤や化粧料等における有効成分としては、抗炎症作用を有する成分や動植物エキス、あるいは保湿効果の高いアミノ酸や、多糖、脂質、動植物抽出エキス等が皮膚の炎症や角質層の水分の消失を防ぐ能力に優れているために用いられてきた。しかしながらいづれにおいてもその肌荒れ改善・予防効果は必ずしもすべての事例において十分ではなかった。

【0005】 体組織への親和性を保つヒアルロン酸塩は、含水系の中では紫外線や酵素などによって分解され、分子量の低下に伴って保湿効果も減少する。また、ヒアルロン酸は細胞間組織として存在し、血管透過性とも関与している。更に、ヒアルロニダーゼは肥満細胞中において活性化により、肥満細胞から脱顆粒に関与していると言われている。従ってヒアルロン酸の加水分解酵素であるヒアルロニダーゼの活性を阻害することにより、ヒアルロン酸の安定化をはかり、肥満細胞からの種々ケミカルメディエーターの放出を防ぐことができ、保湿の強化あるいは抗炎症が期待できる。

【0006】 ヒスタミンはマストセルに抗原が一度感作

し、IgE抗体をセル膜に標識する。次に再度抗原が侵入した場合、抗原抗体反応により即座に脱顆粒反応が生じ、ヒスタミン遊離が起こる。このときヒスタミンとパラレルにヘキシサミニダーゼの遊離が起こるため、ヒスタミン遊離の指標となる。このヒスタミンは毛細血管拡張、平滑筋収縮、胃酸分泌など多くの薬理作用を持つ。

【0007】 中国では古来藤茶の枝葉部を飲料として利用する地方がある他は、風邪、のどの痛み、急性結膜炎等に民間薬として利用されてきた。藤茶はぶどう科に属し、中国の中部から南部にわたる広い地域に自生する多年生の植物であり、台湾等では栽培もされている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、古来食品や民間薬等の分野で使用されて安全性が確認されている天然物由来の物質の中から、ヒアルロニダーゼ阻害作用、ヘキシサミニダーゼ遊離阻害作用、サイクリック AMP ホスホジエステラーゼ阻害作用を有するものを見出し、それらを有効成分としたヒアルロニダーゼ阻害剤、ヘキシサミニダーゼ遊離阻害剤、サイクリック AMP ホスホジエステラーゼ阻害剤を提供することを目的とする。

【0009】 更に、皮膚疾患や肌荒れといった頭皮又は皮膚のトラブルの改善・予防効果に優れた肌荒れ改善化粧料を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】 上記目的を達成するために、本発明は、藤茶からの抽出物を有効成分として含有するヒアルロニダーゼ阻害剤、ヘキシサミニダーゼ遊離阻害剤、サイクリック AMP ホスホジエステラーゼ阻害剤を提供するとともに、これらの作用剤を含有する肌荒れ改善化粧料を提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】 以下に、本発明について更に詳細に説明すると、本発明に係るヒアルロニダーゼ阻害剤は、藤茶抽出物からなるものであって、ヒアルロニダーゼ阻害物質を有効成分として含有するものである。

【0012】 また、本発明に係るヘキシサミニダーゼ遊離阻害剤は、藤茶抽出物からなるものであって、ヘキシサミニダーゼ遊離阻害物質を有効成分として含有するものである。

【0013】 なお、本発明に係るサイクリック AMP ホスホジエステラーゼ阻害剤は、藤茶抽出物からなるものであって、サイクリック AMP ホスホジエステラーゼ阻害物質を有効成分として含有するものである。

【0014】 更に、本発明に係る肌荒れ改善化粧料は、ヒアルロニダーゼ阻害作用、ヘキシサミニダーゼ遊離阻害作用、サイクリック AMP ホスホジエステラーゼ阻害作用を有する藤茶抽出物を配合してなるものである。

【0015】 本発明における藤茶は、学名 [Ampelopsis cantoniensis (Hook. et Arn.) Planch, Ampelopsis gr

ossedentata (Hand. -Mazz.) W. T. Wang CV) であり、その他 *Ampelopsis* 属のうち、藤茶と呼ばれているものは全て含まれる。

【0016】抽出原料としての藤茶の使用部位は、枝、葉、樹皮、根部であるが、枝葉部が好適に使用され、採取後ただちに乾燥し粉碎したものが適当である。乾燥は天日で行ってもよいし、通常使用される乾燥機を用いて行ってもよい。藤茶は、ヘキサン、ペンゼン等の非極性溶媒によって脱脂等の前処理を施してから抽出原料として使用してもよい。脱脂等の前処理を行うことにより、藤茶の極性溶媒による抽出処理を効率よく行うことができる。

【0017】また、藤茶から得られるヒアルロニダーゼ阻害物質、ヘキソサミニダーゼ遊離阻害物質、サイクリックAMPホスホジエステラーゼ阻害物質の詳細は不明であるが、藤茶から各種の溶媒を用いて得られた抽出物に阻害活性が認められる。

【0018】本発明に係る抽出物は、水、エタノールやイソプロパノールなどの各種脂肪族低級アルコール、1,3-ブチレングリコール、エチレングリコール、グリセリン、イソプレングリコールなどの親水性有機溶媒、これら各種親水性有機溶媒又は水との混液などの各種水系有機溶媒を用いて得られ、この藤茶抽出物が、高いヒアルロニダーゼ阻害作用、ヘキソサミニダーゼ遊離阻害作用、サイクリックAMPホスホジエステラーゼ阻害作用を示す。しかも、これらの水系溶媒は取扱いが容易で、抽出作業が比較的容易に行える。

【0019】2種以上の極性溶媒の混合液を抽出溶媒として使用する場合、その混合比は、適宜調製することができる。例えば水と低級脂肪族アルコールとの混合液を使用する場合には、水と低級脂肪族アルコールとの混合比は自由に調製することができるが、7:3~2:8(質量比)が好適である。

【0020】抽出方法や抽出条件等も特に限定されるものではないが、好適には質量比で用いる藤茶量の5~15倍量の前記抽出溶媒に浸漬し、常温ないし90℃程度の加熱・加温下で、ゆるやかに攪拌しながら可溶性成分を溶出させる。この後、当該抽出液をろ過又は遠心分離し、固液分離して目的となる抽出物を得る。

【0021】こうして得られた抽出液はそのまま、本発明に係るヒアルロニダーゼ阻害剤、ヘキソサミニダーゼ遊離阻害剤、サイクリックAMPホスホジエステラーゼ阻害剤として用いることもできるが、活性が低い場合もあるため、適宜濃縮したエキス状物、あるいは、例えばスプレードライ、真空乾燥、熱風乾燥などの方法を用いて更に乾固させ、乾燥エキスとして用いることも可能である。また、上記活性を阻害しない範囲で、必要に応じて簡単な精製処理を施してもよい。このエキス状物や乾燥エキスもそのまま用いたり、あるいはデンプンや乳糖などの各種賦形剤を添加して用いることができるのは言

うまでもない。

【0022】また、藤茶抽出物は、一般的な植物抽出物の製剤化による公知の方法により単独で、あるいは適当な助剤を用いて、例えば軟膏、パップ、クリーム、乳液、ローション、パック、ゼリー、浴用剤、液体石鹸、固形石鹸等、頭皮・頭髮に対するものとして、トニック、リンス、シャンプー、アストリンゼント等、いずれの形で適用することもでき、剤型は特に問わない。

【0023】製剤中における藤茶抽出物の配合量は、適宜、使用目的、性別、症状等を考慮して検討すればよいが、藤茶抽出物の量として約0.005~10質量%であり、好ましくは0.05~5質量%である。また、藤茶枝葉は古来より飲料や民間薬として使用されてきており、その安全性は確認されているものであって、副作用なく使用できるものである。

【0024】更に、本発明に係る肌荒れ改善化粧料には、ヒアルロニダーゼ阻害作用、ヘキソサミニダーゼ遊離阻害作用、サイクリックAMPホスホジエステラーゼ阻害作用を妨げない限り、化粧料の製造に通常用いられる各種主剤及びその他の任意の助剤を適宜使用することができる。

【0025】これらの肌荒れ改善化粧料の主剤として併用可能なものとして具体的に挙げると次のとおりである。

【0026】収斂剤として、クエン酸又はその塩類、酒石酸又はその塩類、乳酸又はその塩類、塩化アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウム、アラントインクロロヒドロキシアリミニウム、アラントインジヒドロキシアリミニウム、パラフェノールスルホン酸亜鉛、硫酸亜鉛、ジユエキス、エイジツエキス、ハママリスエキス、ゲンノショウコエキス、茶カテキン類、プロアントシアニン類、ガイヨウエキス、オドリコソウエキス、オトギリソウエキス、ダイオウエキス、ヤグルマソウエキス、スギナエキス、キズタエキス、キューカンバーエキス、マロニエエキス、サルビアエキス、メリッサエキス、タマリンドハスクエキス等が挙げられる。

【0027】また、殺菌・抗菌剤として、安息香酸、安息香酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸エステル、塩化ジステアリルメチルアンモニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化アルキルジアミノエチルグリシン液、塩酸クロルヘキシジン、オルトフェニルフェノール、感光素101号、感光素201号、サリチル酸、サリチル酸ナトリウム、ソルビン酸、ハロカルバン、レゾルシン、パラクロロフェノール、フェノキシエタノール、ビスボロー、ヒノキチオール、メントール、キトサン、キトサン分解物、ジユエキス、クジンエキス、エンメイソウエキス、ビワエキス、ウワウルシエキス、ホップエキス、ユッカエキス、アロエエキス、ケイヒエキス、ガジュツエキス、油溶性甘草エキス(カンゾウ疎水性フラボノイド、グラブリジン、グラブレン、リコカルコンA)等が

挙げられる。

【0028】また、紫外線吸収剤として、 β -イソプロピルフラノン誘導体、ウロカニン酸、ウロカニン酸エチル、オキシベンゾン、オキシベンゾスルホン酸、テトラヒドロキシベンゾフェノン、ジヒドロキシジメトキシベンゾフェノン、ジヒドロキシベンゾフェノン、シノキサート、ジイソプロピルケイヒ酸メチル、メトキシケイヒ酸オクチル、パラアミノ安息香酸グリセリル、パラジメチルアミノ安息香酸アミル、パラジメチル安息香酸オクチル、パラアミノ安息香酸オクチル、パラアミノ安息香酸、パラアミノ安息香酸エチル、ブチルメトキシジベンゾイルメタン、酸化チタン、 β -カロチン、 γ -オリザノール、コメヌカエキス、アロエエキス、カバノキエキス、シラカンバエキス、カミツレエキス、コゴメグサエキス、セイヨウサンザシエキス、ヘンナエキス、チョウチグルミエキス、マロニエエキス、イチヨウ葉エキス、カミツレエキス、油性カンゾウエキス等が挙げられる。

【0029】更に保湿剤として、セリン、グリシン、スレオニン、アラニン、コラーゲン、加水分解コラーゲン、ヒドロネクテン、フィブロネクテン、ケラチン、エラスチン、ローヤルゼリー、コンドロイチンヘパリン、グリセロリン酸脂質、スフィンゴリン脂質、スフィンゴ糖脂質、リノール酸又はそのエステル類、エイコサペンタエン酸又はそのエステル類、ペクチン、アルゲコロイド、ピフィズ菌発酵物、乳酸発酵物、酵母抽出物、レイシ菌糸培養物又はその抽出物、小麦胚芽油、アボガド油、米胚芽油、ホホバ油、ダイズリン脂質、 γ -オリザノール、ピロウダアオイエキス、ヨクイニンエキス、ジオウエキス、タイソウエキス、カイソウエキス、キダチアロエエキス、ゴボウエキス、マロニエエキス、マンネンロウエキス、アルニカエキス、小麦フスマ、コメヌカエキス等が挙げられる。

【0030】また、細胞賦活剤として、胎盤抽出物、リボフラビン又はその誘導体、ピリドキシン又はその誘導体、ニコチン酸又はその誘導体、パントテン酸又はその誘導体、 α -トコフェロール又はその誘導体、アルニカエキス、ニンジンエキス、オタネニンジンエキス、エゾウコギエキス、ヘチマエキス（サボニン）、シコンエキス、シラカンバエキス、オウバクエキス、ボタンビエキス、シャクヤクエキス、ムクロジエキス、ベニバナエキス、アシタバエキス、ビワ葉エキス、ヒキオコシエキス、ユキノシタエキス、黄杞エキス、サルビアエキス、ニンニクエキス、マンネンロウエキス等が挙げられる。

【0031】消炎・抗アレルギー剤としてアズレン、アラントイン、アミノカプロン酸、インドメタシン、塩化リゾチーム、イブシロンアミノカプロン酸、オキシベンゾン、グリチルリチン酸又はその誘導体、グリチルレチン酸又はその誘導体、感光素301号、感光素401号、塩酸ジフェンヒドラミン、トラネキサム酸又はその

誘導体、アデノシンリン酸、エストラジオール、エスロン、エチニルエストラジオール、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、プロゲステロン、コルチコステロン、アルニカエキス、インチンコウエキス、サンシシエキス、ジュウヤクエキス、セイヨウトチノキエキス、カンゾウエキス、トウキエキス、ヨモギエキス、ワレモコウエキス、リンドウエキス、サイコエキス、センキュウエキス、ボウフウエキス、セイヨウノコギリソウエキス、オウレンエキス、シソエキス、マロニエエキス、オウゴンエキス等が挙げられる。

【0032】抗酸化・活性酸素消去剤としてジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、没子食酸プロピル、パカリン、パカレイン、スーパーオキサイドディスムターゼ、カタラーゼ、ローズマリーエキス、メリッサエキス、オウゴンエキス、エイジツエキス、ビワ葉エキス、ホップエキス、ハマメリスエキス、シャクヤクエキス、セージエキス、キナエキス、カミツレエキス、ユーカリエキス、シソエキス、イチヨウ葉エキス、タイムエキス、カルダモンエキス、キャラウェイエキス、ナツメグエキス、メースエキス、ローレルエキス、クローブエキス、ターメリックエキス、ヤナギタデエキス等が挙げられる。

【0033】更に、助剤として併用可能なものを次に挙げると、油脂類として大豆油、アマニ油、桐油、ゴマ油、ヌカ油、綿実油、ナタネ油、サフラワー油、トウモロコシ油、オリーブ油、ツバキ油、アーモンド油、ヒマシ油、落花生油、カカオ油、モクロー、ヤシ油、パーム核油、牛脂、ミンク油、卵黄油、ホホバ油、月見草油、馬油等が挙げられる。

【0034】ロウ類としてカルナウバロウ、キャンデリラロウ、蜜ロウ、サラシ蜜ロウ、鯨ロウ、セラックス、ラノリン類等が挙げられる。

【0035】また、炭化水素類として、流動パラフィン、ワセリン、マイクロシリスタリンワックス、セレシン、スクワラン、ポリエチレン末が挙げられる。

【0036】脂肪酸類としては、ステアリン酸、リノール酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ヘベニン酸、ラノリン酸、オレイン酸、ウンデシレン酸、イソステアリン酸等が挙げられる。

【0037】更に、アルコール類として、ラウリルアルコール、セチルアルコール、ステアリルアルコール、ラノリンアルコール、水添ラノリンアルコール、オレイルアルコール、ヘキサデシルアルコール、2-オクチルドデカノール、グリセリン、ソルビトール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、エチレングリコール又はその重合体、ブドウ糖、白糖、コレステロール、フィトステロール、セトステアリルアルコール等が挙げられる。

【0038】また、エステル類としてオレイン酸デシル、ステアリン酸ブチル、ミリスチン酸ミリスチル、ラ

20

30

40

50

ウリン酸ヘキシル、パルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソプロピル、ミリスチン酸オクチルドデシル、ジメチルオクタン酸ヘキシルデシル、ジオレイン酸プロピレングリコール、フタル酸ジエチル、モノステアリン酸プロピレングリコール、モノステアリン酸エチレングリコール、モノステアリン酸グリセリン、トリミリスチン酸グリセリン、酢酸ラノリン、乳酸セチル等が挙げられる。

【0039】また、界面活性剤として、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、両イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0040】そして香料にはメントール、カルボン、オイゲノール、アネトール、ハッカ油、スペアミント油、ペパーミント油、ユーカリ油、アニス油その他各種動植物からのオイル状香料が挙げられる。

【0041】

【実施例】以下、本発明に係る実施例を示し、本発明について更に詳細に説明する。

【0042】〔製造例1〕乾燥した藤茶枝葉部の粗碎物500gを水5リットルに投入し、還流加熱下に4時間抽出した。その後、濾過して得られた抽出液を減圧下に濃縮してペースト状物を得、それを凍結乾燥して、粉末状抽出物97gを得た。

【0043】〔製造例2〕乾燥した藤茶枝葉部の粗碎物500gを50容量%含水エタノール5リットルに投入し、還流加熱下に4時間抽出した。その後、濾過して得られた抽出液を減圧下に濃縮してペースト状物を得、それを凍結乾燥して、粉末状抽出物130gを得た。

【0044】〔製造例3〕乾燥した藤茶枝葉部の粗碎物500gをエタノール5リットルに投入し、還流加熱下に4時間抽出した。その後、濾過して得られた抽出液を減圧下に濃縮してペースト状物を得、それを凍結乾燥して、粉末状抽出物79gを得た。

【0045】〔製造例4〕乾燥した藤茶枝葉部の粗碎物500gを1,3-ブチレングリコール7リットルに投入し、95℃で5時間抽出した。冷却後、濾過して得られた濾液を5℃に5日間静置し、生じたオリや沈殿をケイソウ土濾過により除去し、澄明な抽出液（固形分濃度1.05質量%）6リットルを得た。

【0046】〔製造例5〕乾燥した藤茶枝葉部の粗碎物500gを80容量%エタノール5リットルに投入し、還流加熱下に4時間抽出した。得られた抽出液を濾過し、減圧下に濃縮してペースト状物を得、それを凍結乾燥

<表1>

抽出溶媒
水
エタノール/水 (1/1)
エタノール

【0052】表1に示される結果より、藤茶抽出物がヒアルロニダーゼ活性を阻害する作用を有することが確認

* 操して、粉末状抽出物100gを得た。

【0047】〔製造例6〕乾燥した藤茶枝葉部の粗碎物500gをプロピレングリコール7リットルに投入し、95℃で5時間抽出した。冷却後、濾過して得られた濾液を5℃に5日間静置し、生じたオリや沈殿をケイソウ土濾過により除去し、澄明な抽出液（固形分濃度0.26質量%）6リットルを得た。

【0048】〔試験例1〕ヒアルロニダーゼ阻害作用の試験

ヒアルロニダーゼ溶液（400ユニット/mL, pH 3.5 酢酸緩衝液）0.1mLと試料溶液0.2mLを混合し、37℃で20分間インキュベーションしたのち、活性化剤溶液（2.5mM-CaCl₂）0.2mLを加え、37℃で20分間インキュベーションして酵素を活性化した。ヒアルロン酸カリウム緩衝液0.5mLを加え、37℃で40分間インキュベーションした後、0.4N水酸化ナトリウム0.2mLを加えると共に氷冷して反応を停止させた。次いで0.8Mホウ酸溶液（pH9.1）0.2mLを加え、沸騰浴中で3分間加熱後、直ちに20分間氷冷した。p-DABA試薬（p-ジメチルアミノベンズアルデヒド10gを10N塩酸12.5mLと酢酸87.5mLの混合液に溶解し、酢酸で10倍に希釈したもの）6.0mLを加えて37℃で20分間インキュベーションしたことにより、上記酵素反応で遊離したN-アセチルグルコサミンを発色させ、波長585nmの吸光度を測定した。同様の操作と吸光度測定を、酵素を添加せずに行なった。更に、試料溶液を添加せずに蒸留水を添加した場合についても同様の測定を行い、次式によりヒアルロニダーゼの阻害率を求めた。

【0049】

【式1】

阻害率 (%) = {1 - (A - B) / (C - D)} × 100
但し

A : 酵素添加, 試料溶液添加時の吸光度

B : 酵素無添加, 試料溶液添加時の吸光度

C : 酵素添加, 試料溶液無添加時の吸光度

D : 酵素無添加, 試料溶液無添加時の吸光度

【0050】試料濃度を段階的に減少させて上記阻害率の測定を行い、阻害率が50%になる試料濃度(ppm)を内挿法により求めた。

【0051】

50%阻害濃度 (ppm)

256

245

>400

された。

【0053】〔試験例2〕ヒスタミン遊離抑制試験

細胞内のヒスタミンが遊離されると同時にヘキソサミニダーゼも遊離されることから、ヘキソサミニダーゼ遊離を指標にヒスタミン遊離抑制作用を評価する。25mLの培養フラスコに入れた培地（15%FBS添加S-MEM培地；以下同じ）にRBL-2H3細胞 1.0×10^6 個を播種し、37℃、5%CO₂ - 95%airの下で4日間培養した。次いでトリプシン処理し、遠心分離（800rpm, 4分間）して細胞を集めた。得られた細胞を 4.0×10^5 cell/mLで培地に懸濁し、そこにマウスモノクローナル抗ジニトロフェニル基IgE（DNP-Specific IgE）を0.5 μ g/mLの濃度で添加した。この細胞浮遊液を96穴プレートの1穴に付き100 μ Lずつ播種し、37℃、5%CO₂ - 95%airの下で24時間培養した。培養終了後、各穴中の培地を除去し、シラガニアン緩衝液で2回洗浄した。次に上記緩衝液30 μ L及び試料溶液10 μ Lを加え、37℃で10分間インキュベーションした。次にジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン（DNP-BSA）10 μ Lを加え、更に37℃で15分間インキュベーションした。その後、氷冷下で上清10 μ Lを新たな96穴プレートに移し替え、これに1mmol/L p-ニトロフェニル-N-アセチル- β -D-*

<表2>

抽出溶媒
水
エタノール/水 (1/1)
エタノール

【0057】表2に示される結果より、藤茶抽出物がヘキソサミニダーゼ遊離を阻害する作用を有することが確認された。

【0058】〔試験例3〕サイクリックAMPホスホジエステラーゼ阻害試験

5mMの塩化マグネシウムを含有するトリス塩酸緩衝液（pH7.5）0.2mLに胎児血清アルブミン溶液0.1mL及びサイクリックAMPホスホジエステラーゼ溶液0.1mLを加え、更に試料溶液0.05mLを加え、37℃で5分間プレインキュベーションした。次いでサイクリックAMP溶液0.05mLを加え、37℃で60分間インキュベーションした。沸騰浴中で3分間煮沸して反応を停止させ、4℃で3500rpm遠心40

<表3>

抽出溶媒
水
エタノール/水 (1/1)
エタノール

【0061】表3に示される結果より、藤茶抽出物がサイクリックAMPホスホジエステラーゼ活性を阻害する作用を有することが確認された。

【0062】〔配合例〕次に上記で得られた藤茶抽出物★グリセリン

* グルコサミド溶液10 μ Lを加え、37℃で1時間インキュベーションした。反応終了後、0.1mol/L NaCO₃-Na₂HCO₃溶液250 μ Lを加え、マイクロプレートリーダーにて650nmを対照に415nmにおける吸光度Aを測定した。試料溶液の代りにシラガニアン緩衝液を添加した細胞上清についても同様の処理と吸光度測定を行った（このとき測定された吸光度をBとした）。また、細胞上清と0.1mol/L NaCO₃-Na₂HCO₃溶液を同様の処理で反応させたものについても、吸光度測定を行った（このとき測定された吸光度をCとした）。同様の操作をDNP-BSAのかわりにシラガニアン緩衝液を加えたものについても行った（このとき、測定された吸光度をDとした）。そして、次式によりヘキソサミニダーゼ遊離抑制率を求めた。

【0054】

【式2】遊離抑制率 (%) = $[1 - \{ (A - C - D) / (B - D) \}] \times 100$

【0055】試料濃度を段階的に減少させて上記抑制率の測定を行い、ヘキソサミニダーゼの遊離を50%阻害する試料濃度(ppm)を内挿法により求めた。

【0056】

50%阻害濃度 (ppm)

71

54

38

※ 心分離し、上清中の反応基質・5'-AMPを高速液体クロマトグラフィーにより定量した。試料溶液を添加せずに同様の酵素反応と反応基質の分析を行い、試料無添加時の反応基質量に対する試料添加時の反応基質量の比率より、試料のサイクリックAMPホスホジエステラーゼ阻害率を求めた。

【0059】試料溶液の試料濃度を段階的に減少させて上記の測定を繰り返し、サイクリックAMPホスホジエステラーゼの活性を50%阻害する試料濃度IC₅₀ (ppm)を内挿法により求めた。その結果を表3に示す。

【0060】

50%阻害濃度 (ppm)

171

110

157

★を用いて以下の配合例を製造したところ、いずれの場合においても、良好な製剤を得ることができた。

【0063】（配合例1）下記組成の化粧水を常法により製造した。

3.0g

11

12

1, 3-ブチレングリコール	3. 0 g
グリチルリチン酸ジカリウム	0. 5 g
オレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (20E.0)	0. 5 g
パラオキシ安息香酸メチル	0. 15 g
クエン酸	0. 1 g
クエン酸ソーダ	1. 0 g
アスコルビン酸リン酸マグネシウム	0. 1 g
オウゴン抽出物	0. 5 g
オウレン抽出物	0. 5 g
製造例1の藤茶抽出物	1. 0 g
香料	0. 05 g
精製水	残部 (全量を100 gとする)

【0064】(配合例2) 下記組成の化粧水を常法により* * 製造した。

グリセリン	5. 0 g
プロピレングリコール	4. 0 g
ポリオキシエチレンセチルエーテル	2. 0 g
エタノール	10. 0 g
クエン酸・リン酸塩緩衝剤	微量
パラオキシ安息香酸メチル	適量
アントラニル酸メチル	適量
ビワ抽出物	0. 5 g
レイシ抽出物	0. 5 g
製造例3の藤茶抽出物	1. 0 g
香料	0. 1 g
精製水	残部 (全量を100 gとする)

【0065】(配合例3) 下記組成の洗浄用化粧水を常法※ ※ により製造した。

プロピレングリコール	8. 0 g
ポリエチレングリコール1500	5. 0 g
ヒドロキシメチルセルロース	0. 1 g
ポリオキシエチレンモノオレイルエーテル	1. 0 g
水酸化カリウム	0. 05 g
エタノール	20. 0 g
サリチル酸	0. 1 g
グリチルリチン酸ジカリウム	0. 5 g
アロエ抽出物	0. 5 g
インチンコウ抽出物	0. 5 g
黄杞抽出物	0. 5 g
製造例2の藤茶抽出物	1. 0 g
香料	0. 2 g
精製水	残部 (全量を100 gとする)

【0066】(配合例4) 下記組成のクリームを常法に★ ★ により製造した。

流動パラフィン	5. 0 g
サラシミツロウ	4. 0 g
セタノール	3. 0 g
スクワラン	10. 0 g
ラノリン	2. 0 g
ステアリン酸	1. 0 g
オレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (20E.0)	1. 5 g
自己乳化型ステアリン酸グリセリン	3. 0 g
1, 3-ブチレングリコール	6. 0 g

13

14

パラオキシ安息香酸メチル	0.5 g
油溶性甘草エキス	0.5 g
ジュ抽出液	0.3 g
製造例5の藤茶抽出物	1.0 g
香料	0.1 g
精製水	残部(全量を100 gとする)

【0067】(配合例5) 下記組成のクリームを常法に* *より製造した。

流動パラフィン	5.0 g
サラシミツロウ	4.0 g
セタノール	3.0 g
スクワラン	10.0 g
ラノリン	2.0 g
ステアリン酸	1.0 g
オレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (20E.0)	1.5 g
自己乳化型ステアリン酸グリセリン	3.0 g
1, 3-ブチレングリコール	6.0 g
ヒノキチオール	0.5 g
イチョウ抽出物	0.5 g
エンメイソウ抽出物	0.3 g
製造例3の藤茶抽出物	1.0 g
香料	0.1 g
精製水	残部(全量を100 gとする)

【0068】(配合例6) 下記組成のクリームを常法に※ ※より製造した。

ステアリン酸	14.0 g
ワセリン	2.0 g
モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン	1.5 g
自己乳化型ステアリン酸グリセリン	2.5 g
プロピレングリコール	10.0 g
パラオキシ安息香酸ナトリウム	適量
酢酸トコフェロール	適量
ウコン抽出物	0.3 g
コウボ抽出物	0.3 g
製造例4の藤茶抽出物	1.0 g
香料	0.3 g
精製水	残部(全量を100 gとする)

【0069】(配合例7) 下記組成のパックを常法によ★ ★り製造した。

カオリン	46.5 g
タルク	18.0 g
酸化亜鉛	18.0 g
オリーブ油	2.0 g
モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン	1.0 g
プロピレングリコール	8.0 g
パラオキシ安息香酸エチル	適量
ブルー抽出物	0.5 g
ユキノシタ抽出物	0.5 g
製造例4の藤茶抽出物	5.0 g
香料	0.5 g

【0070】(配合例8) 下記組成のパックを常法によ☆ ☆り製造した。

ポリビニルアルコール	15.0 g
カルボキシメチルセルロース	5.0 g

15

16

グリセリン	3.0 g
エタノール	10.0 g
パラオキシ安息香酸エチル	0.05 g
酢酸トコフェロール	適量
ワレモコウ抽出物	0.3 g
緑茶抽出物	0.3 g
ニンジン抽出物	0.3 g
製造例 5 の藤茶抽出物	5.0 g
香料	0.05 g
精製水	残部 (全量を 100 g とする)

【0071】 (配合例 9) 下記組成のシャンプーを常法* *により製造した。

ラウリン酸トリエタノールアミン塩	16.0 g
ラウリン酸ジエタノールアミド	4.0 g
エチレンジグリコールジステアレート	2.0 g
エチレンジグリコールモノステアレート	2.0 g
パラヒドロキシ安息香酸ブチル	0.2 g
エンメイソウ抽出物	0.3 g
イチョウ抽出物	0.3 g
アロエ抽出物	0.2 g
製造例 1 の藤茶抽出物	0.5 g
香料	0.1 g
着色料	0.1 g
精製水	残部 (全量を 100 g とする)

【0072】 (配合例 10) 下記組成の浴用剤(粉末状)※ ※を常法により製造した。

硫酸ナトリウム	45.0 g
炭酸水素ナトリウム	51.0 g
ホウ砂	2.0 g
色素	適量
香料	適量
製造例 1 の藤茶抽出物	1.0 g
オウバク抽出物	0.1 g
ガイヨウ抽出物	0.1 g
カミツレ抽出物	0.1 g

【0073】 (配合例 11) 下記組成の浴用剤(顆粒状)★ ★を常法により製造した。

硫酸ナトリウム	45.0 g
炭酸水素ナトリウム	50.0 g
ホウ砂	2.0 g
カルボキシメチルセルロース	1.0 g
色素	適量
香料	適量
製造例 2 の藤茶抽出物	1.0 g
ショウブ抽出物	0.1 g
センキュウ抽出物	0.1 g
チンピ抽出物	0.1 g
トウキ抽出物	0.1 g

【0074】 (配合例 12) 下記組成の浴用剤(錠剤)を☆ ☆常法により製造した。

硫酸ナトリウム	50.0 g
炭酸水素ナトリウム	16.0 g
炭酸ナトリウム	5.0 g
クエン酸	27.0 g

17

18

トウヒ抽出物	0.1 g
グリチルリチン酸ジカリウム	0.1 g
モモ抽出物	0.1 g
ユズ抽出物	0.1 g
製造例 3 の藤茶抽出物	1.0 g
色素	適量
香料	適量

【0075】

*リック AMP ホスホジエステラーゼ阻害剤及び肌荒れ改善化粧料を提供することができる。

【発明の効果】本発明によれば安全で新規なヒアルロニダーゼ阻害剤、ヘキシサミニダーゼ遊離阻害剤、サイク*10

フロントページの続き

F ターム(参考) 4C083 AA08 AA11 AA12 AB03 AB21
 AB27 AB31 AB35 AB43 AC02
 AC07 AC10 AC12 AC18 AC24
 AC30 AC39 AC42 AC44 AC47
 AC48 AC54 AC55 AD04 AD09
 AD11 AD27 AD51 AD53 AD55
 AD64 AD66 CC02 CC04 CC05
 CC07 CC25 CC38
 4C088 AB56 AC05 BA08 CA05 CA08
 MA28 MA63 NA14 ZA89 ZC20